

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(81) 指定国(国内): AU, CA, CN, KR, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(57) 要約:

a) CDR-H1として、

Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Asn-Tyr-Gly-Met-Asn

b) CDR-H2として、

Trp-Ile-Asn-Thr-Tyr-Thr-Gly-Glu-Pro-Thr-Tyr-Ala-Asp-Asp-Phe-Lys-Gly

c) CDR-H3として、

Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Phe-Asp-Tyr

のアミノ酸配列を少なくとも一つ有するヒトTNF α に対する組換え型抗体のH鎖ポリペプチドまたはその断片、

a') CDR-L1として、

Thr-Ala-Ser-Ser-Ser-Val-Ser-Phe-Ser-Tyr-Leu-His

b') CDR-L2として、

Tyr-Ser-Thr-Ser-Asn-Leu-Ala-Ser

c') CDR-L3として、

His-Gln-Tyr-Leu-Arg-Ser-Pro-Tyr-Thr

のアミノ酸配列を少なくとも一つ有するヒトTNF α に対する組換え型抗体のL鎖ポリペプチド、並びに上記H鎖ポリペプチドまたはその断片およびL鎖ポリペプチドからなるヒトTNF α に対するヒト型化抗体またはその断片を提供する。該抗体等をコードする遺伝子を有する発現ベクターで宿主細胞を形質転換して培養し、ヒト型化抗TNF α 抗体を製造する方法も提供する。

明細書

新規組換え型抗体とそのCDRのアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子

5 技術分野

本発明は、ヒトTNF α の活性を阻害する抗体の抗原結合に関する新規なアミノ酸配列とそれをコードする遺伝子、およびこれらの配列を含む遺伝子組み換え型抗体、特にヒト型化抗体、該抗体の生産方法及び該抗体を含有する医薬組成物に関する。

10

従来の技術

腫瘍壞死因子 α (TNF α) は細胞に対して多岐に渡る生物活性を有する炎症性サイトカインである (Proc Natl Acad Sci USA 72, 3666, 1975)。TNF α はマクロファージやマスト細胞およびリンパ系細胞など多くの種類の細胞から産生され、細胞表層に存在する特異的なレセプターに結合することによってその効果を発揮する (Annu Rev Biochem 57, 505, 1988)。TNF α の作用には、例えば腫瘍細胞やウイルス感染細胞を破壊するといった有益なものも含まれるが、生体にとって明らかに有害な作用も存在する。例えば、TNF α は敗血性ショック症状の主たる原因物質であることが知られており (Science 234, 470, 1986)、また、慢性関節リウマチや多発性硬化症、マラリア等の疾患においては全身的もしくは局所的なTNF α の過剰産生が原因となっていると考えられている (Proc Natl Acad Sci USA 89, 9784, 1992, J Infect Dis 161, 1148, 1990, J Exp Med 170, 607, 1989)。このような疾患においてはTNF α の過剰産生を抑制したり、TNF α の生物学的活性を阻害することがその病態改善に有用であると考えられる。

抗体は一般に、抗原との親和性が強く、且つ特異性が高いことが知られ、特に抗原の生物学的活性を阻害する中和抗体は医薬としての利用が期待されている。従来、抗体としてはウサギ抗血清由来のポリクローナル抗体や、マウスやラットなどのモノクローナル抗体が作製され、種々の用途に提供してきた。しかしな

がら、これら非ヒト由来の抗体はヒトにおいて高い免疫原性を有し、これらの抗体のヒトへの投与の結果として產生されるこれら非ヒト由来の抗体に対するヒト抗体が、期待した効果の妨げとなるのみならず、患者における免疫反応に基づく重篤な副作用を誘起するという問題点がある。従って、このような抗体を医薬として患者に投与することには大きな制約があった。

抗体分子は2種類のポリペプチドから構成され、分子量の大きい方のポリペプチドはH鎖と呼ばれ、小さい方のポリペプチドはL鎖と呼ばれる。また、各々のポリペプチドは、抗原結合部位を形成する可変領域と、抗体のクラス毎にほぼ一定の構造を持つ定常領域とから成る。可変領域は、抗原結合部位の形成にさらに密接に関与する相補性決定領域(CDR)と、その間に介在するフレームワークと呼ばれる領域から成る。CDRは、H鎖とL鎖の各々に対して3箇所ずつ(合計6箇所)存在し、それぞれN末端側からCDR-1、CDR-2、CDR-3と命名されている。抗体の抗原に対する親和性や特異性は、主としてこれらのCDRのアミノ酸配列によって決定されていることが知られている。

近年、抗体を医薬として利用するための新たな方法として、ヒト・マウスキメラ抗体あるいはヒト型化抗体の作製方法が報告されている(Nature 328, 323, 1988)。ヒト・マウスキメラ抗体では、抗原結合部位を含む可変領域がマウスのモノクローナル抗体に由来し、定常領域が適当なヒト抗体に由来するキメラ型の抗体である。キメラ抗体は元のマウス抗体の完全な可変領域を含有することから、元のマウス抗体と同一の親和性および特異性をもって抗原に結合することが期待できる。またこのキメラ抗体は、マウス由来のアミノ酸配列が可変領域に限られていることから、元のマウス抗体に比べ免疫原性が低下していると期待される。一方、ヒト型化抗体はマウス抗体のCDRをヒト抗体可変領域に移植して作製する(Immunol. Today, 14, 243, 1993, Int Rev Immunol 10, 241, 1993)。ヒト型化抗体は、ヒト以外に由来するアミノ酸配列はCDRのみであり、マウスCDRを移植したヒト型化抗体は、キメラ抗体よりもさらにヒトに対する免疫原性が低いと考えられる。

TNF α に対する中和抗体はこれまでに数多く報告されている。例えば、マウスの慢性関節リウマチの疾患モデルで有効性を示すTNF α 抗体(Proc Natl Ac

ad Sci USA 89, 9784, 1992)、マウス敗血症モデルで病態を改善する TNF α 抗体 (Nature 330, 662, 1987)、さらに実際にヒトの慢性関節リウマチ患者で有効性が示された TNF α 抗体 (Lancet 344, 1105, 1994) などがある。しかしながら、これらの抗体はマウス由来のモノクローナル抗体であるか、もしくはヒト・マウスキメラ抗体であり、これらの抗体のアミノ酸配列やそれをコードする遺伝子、特に抗原である TNF α の認識に関与する CDR のアミノ酸配列やそれをコードする遺伝子は知られていない。

発明の概要

本発明の課題は、ヒト TNF α に対するヒト型化抗体およびその生産方法を提供することにある。さらに本発明の課題は、これらの抗体と医薬的に許容し得る担体とからなる医薬組成物を提供することにある。

本発明者らは、活性なヒト TNF α を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体、MAB-3B10を開発し、特開昭63-253099号に開示した。本発明者らは、さらに研究を押し進め、MAB-3B10のH鎖可変領域およびL鎖可変領域のアミノ酸配列を解明し、解明されたアミノ酸配列に基づいて、ヒト TNF α に対する組換え型抗体およびその生産方法を提供する。本発明の組換え型抗体は、好ましくはヒト型化抗体である。

図面の簡単な説明

図1は、抗ヒトTNF α マウス中和抗体3B10のH鎖及びL鎖可変領域のアミノ酸配列を示す図である。アミノ酸は1文字略字で示し、Kabatらの方法 (US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) に従い番号を付した。下線はKabatらの方法 (US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) によるCDR領域を示し、四角で囲んだ部分はChothiaらの方法 (J Mol Biol 196, 901, 1987) によるCDR領域を示す。本発明では、いずれかのCDR領域に含まれるアミノ酸を「CDR領域」とみなした。また参考のために、HBS-1抗体のH鎖及びL鎖可変領域のアミノ酸配列を3B10の配列に対応するように併記した。

図2は、抗ヒトTNF α に対するヒト・マウスキメラ抗体の発現ベクターの模式図である。Aは抗ヒトTNF α に対するヒト・マウスキメラ抗体のH鎖の発現ベクタ

ーを示し、Bは抗ヒトTNF α に対するヒト・マウスキメラ抗体のL鎖の発現ベクターを示す。VH, H鎖の可変領域; SH, H鎖のシグナル領域; CH1, CH2, CH3, H鎖の3つの定常領域; VL, L鎖の可変領域; SL, L鎖のシグナル領域; CL, L鎖の定常領域。

5 図3は、ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体の構築手順を示す図である。星印と番号で示した部位は、h3B10-1フレームワークの中でマウス3B10のアミノ酸残基に変換されている部位を示す。L1～L6はh3B10-1のL鎖を作製するために用いたPCR用のプライマーを示し、H1～H6はh3B10-1のH鎖を作製するために用いたPCR用のプライマーを示す。この方法は既に報告された方法 (Cancer Res 53, 851, 1993) に準ずる。

10 図4は、ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体のヒトTNF α との結合性を示すグラフである。各ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体をコードする遺伝子を導入したCOS-1細胞の、遺伝子導入48時間後の培養上清のヒトTNF α との結合性を示す。まず、FCA法によりヒトIgG Fcを持つIgGの量を定量した後、種々のIgG濃度における各ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体のヒトTNF α との結合性をELISA法で調べ、その強さを450 nmにおける吸光度で示した。

15 図5は、ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体のヒトTNF α との結合性を示すグラフである。各ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体をコードする遺伝子を導入したCOS-1細胞の、遺伝子導入48時間後の培養上清のヒトTNF α との結合性を示す。まず、FCA法によりヒトIgG Fcを持つIgGの量を定量した後、種々のIgG濃度 (A) あるいは1.0 ng/ml (B) における各ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体のヒトTNF α との結合性をELISA法で調べ、その強さを450 nmにおける吸光度で示した。(B) ではデータを平均±標準偏差で示す。

発明の詳細な説明

20 本発明のヒトTNF α に対する組換え型抗体は、以下のアミノ酸配列からなるH鎖可変領域及びL鎖可変領域のCDR-1, CDR-2及びCDR-3の少なくとも一つ、好ましくは全部を有する。

H鎖のCDR-H1: Gly-Tyr-Thr-Phe-Thr-Asn-Tyr-Gly-Met-Asn (配列番号: 1)

H鎖のCDR-H2: Trp-Ile-Asn-Thr-Tyr-Thr-Gly-Glu-Pro-Thr-Tyr-Ala-Asp-Asp-

Phe-Lys-Gly (配列番号: 2)

H鎖のCDR-H3: Tyr-Asp-Tyr-Asp-Gly-Phe-Asp-Tyr (配列番号: 3)

L鎖のCDR-L1: Thr-Ala-Ser-Ser-Ser-Val-Ser-Phe-Ser-Tyr-Leu-His (配列番号: 4)

5 L鎖のCDR-L2: Tyr-Ser-Thr-Ser-Asn-Leu-Ala-Ser (配列番号: 5)

L鎖のCDR-L3: His-Gln-Tyr-Leu-Arg-Ser-Pro-Tyr-Thr (配列番号: 6)。

一つの態様において、本発明の抗体は、抗体のH鎖可変領域が図1 (A) の3 B 1 0 の行に示すアミノ酸配列のアミノ酸1~113 位に記載された配列 (配列番号: 7) あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含み、かつL鎖可変領域が図1 (B) の3 B 1 0 の行に示すアミノ酸配列のアミノ酸1~107 位に記載された配列 (配列番号: 8) あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含み、またヒトTNF α を認識する。(これらの配列は、MAB-3 B 1 0 のH鎖およびL鎖の可変領域の配列として本発明において同定されたものである。)

15

本明細書において、「抗体」とは、通常生体内に存在する形の抗体以外に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも1つ含む分子も含む。例えば、通常生体内に存在する形の抗体をパパインで切断した結果得られるFabのような1組のH鎖断片とL鎖から成る蛋白質や、同様にペプシンで切断することによって作製されるF(ab')₂のような2組のH鎖断片とL鎖から成る蛋白質、あるいはH鎖断片とL鎖が同一ペプチド上に直列に結合した1本鎖抗体ScFvなども含まれる。これら通常生体内に存在する形以外の「抗体」は、生体内に存在する形の抗体を蛋白分解酵素で切断することによって得られる場合もあるが、遺伝子組み換え手法によって作製される場合もある。

本発明には、上記本発明の抗体分子の断片であって、上記CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3の少なくとも一つを含む断片も含まれる。例えば、図1 (A) の3 B 1 0 の行のアミノ酸1~113位に記載されたアミノ酸配列のH鎖可変領域あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含むペプチドも

含まれ、さらに、図1 (B) の3 B 1 0の行のアミノ酸1~107位に記載されたアミノ酸配列のL鎖可変領域あるいはそれと実質的に同じ機能のアミノ酸配列を含むペプチドも含まれる。そのようなペプチドを単独または種々組み合わせて、抗体を模倣した種々の人工構築物を製造することが可能である。

5 本明細書において、「実質的に同じ機能」とは、抗体分子上の相補性決定領域のアミノ酸配列や抗原との親和性が実質的に同じであること、および場合によつては親和性がより大きいことを意味する。即ち、可変領域のフレームワークや定常領域のアミノ酸の1ないし数個を他のアミノ酸による置換を行った場合にも、実質的に同じ機能を持った抗体が作製できる場合があり、あるいはヒト型化抗体
10においては抗原に対する親和性がより大きくなる場合があることが知られている。従って、例えば、CDRのアミノ酸配列を一定に保ち、可変領域のフレームワークや定常領域のアミノ酸のいくつかを別のアミノ酸に置換したような、「実質的に同じ機能」を有したいくつかの抗体の「誘導体」を作製することが出来る。そのようなアミノ酸の置換のために、性質の類似したアミノ酸に置換することはよく知られており、例えば塩基性アミノ酸の間の置換、酸性アミノ酸の間の置換、あるいは芳香環をもつアミノ酸の間の置換などが挙げられる。

15 また、可変領域のフレームワークや定常領域でアミノ酸の1ないし数個を欠失または付加しても、「実質的に同じ機能」を有したいくつかの抗体の「誘導体」を作製することが出来ると予想され、それら実質的に同じ機能を有する誘導体も本発明の範囲に含まれる。

20 本発明の抗体またはその断片は、遺伝子組換え手法によって產生できる。

本発明の抗体は、その相補性決定領域以外の構造は、抗ヒトTNF α モノクローナル抗体MAB-3 B 1 0以外であればいかなる抗体を基本としてもよいが、好ましくはヒト抗体を基本とする。ヒト抗体を基本として本発明抗体を製造する場合を例にして説明すれば、先ず、適当なヒトモノクローナル抗体を用意し、そのH鎖およびL鎖の可変領域を、前記の抗ヒトTNF α モノクローナル抗体(MAB-3 B 1 0)のH鎖およびL鎖の可変領域にそれぞれ置換したキメラ抗体を製造する。使用できるヒトモノクローナル抗体に特別の制限はなく、例えばHB
25 S-1と呼ばれるヒト抗HBs抗体(Gastroenterol Jpn 19, 344, 1984; J Immu

nol Methods 222, 83, 1999)が使用できる。キメラ抗体の製造方法は、Proc Natl Acad Sci USA, 81, 6951, 1984に詳しく記載されている。

次に、キメラ抗体をヒト型化抗体に改変する。即ち、キメラ抗体のH鎖およびL鎖の各々について、可変領域のうち相補性決定領域以外のフレームワーク部分をヒト抗体のフレームワーク部分に変更する。そのためには、実施例3に記載するように、Satoらの方法(Cancer Res 53, 851, 1993)を利用して、HBS-1のL鎖およびH鎖可変領域をコードするDNAをそれぞれ鋳型とし、MAB-3B10のCDR-L1～CDR-L3およびCDR-H1～CDR-H3の配列に基づいて作製した適当なプライマー（例えば配列番号：9～14のプライマー-L1～プライマー-L6および配列番号：15～19のプライマー-H1～プライマー-H5）を用いて、フレームワーク部分をヒト型化したMAB-3B10のL鎖およびH鎖可変領域をコードするDNAを増幅する。増幅により得られたL鎖およびH鎖の各々の可変領域をコードするDNAを用い、上記キメラ抗体のL鎖およびH鎖をそれぞれコードするDNAの可変領域を、再度キメラ抗体製造技法で置換する。

得られたヒト型化抗体のL鎖およびH鎖をそれぞれコードするDNAを発現ベクターに組み込み、両者を同一または別々の宿主細胞に形質転換し、L鎖およびH鎖を別個にまたは同時に発現させることにより、ヒト型化抗体を分泌させることが可能である(Proc Natl Acad Sci USA, 84, 241, 1987; Cancer Res, 47, 999, 1987)。

組換え抗体の生産方法として、例えば、COS-1細胞（アフリカミドリザル腎臓由来SV40形質転換細胞）やCHO細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来細胞）に組換え抗体をコードする遺伝子を導入することにより分泌発現することが出来る。遺伝子導入には、種々のベクターが使用可能であり、例えば真核細胞用発現ベクターpdKCR-dhfr (Biochem Biophys Res Commun 164, 39, 1989)に実施例に記載するような改変を加えたもの等が利用出来る。ベクターは、L鎖またはH鎖をコードするDNAを宿主細胞で発現させるために、プロモーター、ターミネーター、その他の要素を有してよい。また、L鎖および/またはH鎖を宿主から分泌させるために、L鎖および/またはH鎖をコードするDNAは、宿主細胞と適合するシグナルペプチドをコードする遺伝子の下流に配置して用いてもよい。

例えばCOS-1細胞は、10%ウシ胎児血清 (FCS) 添加 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM培地) のような培地を用い、5%CO₂ 存在下37°Cで培養する。COS-1細胞への遺伝子導入法や遺伝子導入後の細胞の培養法は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)などの実験書に記載されている。

医薬に用いる抗体を生産する際には、血清由来のウシ抗体等の混入を避けるために、無血清の培地によって培養することが望ましい。こうして培養上清中に分泌された抗TNF α 抗体は、例えばプロテインAを結合させた樹脂などを用いる一般的な抗体精製法 (Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) によって容易に精製することができる。工業生産の場合の宿主細胞としては CHO細胞やマウス骨髓腫細胞Sp2/0などが使用できる。例えば CHO細胞では、MTX などの薬剤により生産性の高いクローンを選択することも可能であり (Immunol Lett 64, 139, 1998)、安定な高生産株が取得できれば、その株は組み換え型抗ヒトTNF α 抗体の工業的な生産に有用である。

本発明の抗体は、可変領域のフレームワーク部分のアミノ酸の一部を別のアミノ酸に置換することにより、ヒトTNF α に対する親和性が向上する場合がある。そのような置換は、例えば、実施例4に示すように、適当な変異を導入したプライマーを用いるPCRを利用して行うことが可能である。

医薬に用いる抗体の形は、生産された抗体分子をそのまま利用することも可能であるが、各種プロテアーゼ処理により得られる抗原結合部位を含む断片を用いてもよい。抗体の形は上述のように、通常生体内に存在する形の抗体以外に、抗体のH鎖もしくはL鎖の可変領域もしくはその組み合わせで形成される抗原結合部位を少なくとも1つ含む断片であればよい。これらの抗体は、遺伝子組み換え手法によって作製してもよいが、遺伝子組み換え手法によって作製された後に蛋白分解酵素を用いて限定分解することによって作製してもよく、その方法は特に限定されるものではない。

また、本発明は、上記本発明の組換え抗体と医薬的に許容し得る担体とからなる医薬組成物を提供する。

本発明の医薬組成物中において、本発明の抗体は、例えば医薬的に許容しうる

成分組成の担体や安定化剤など、人体への投与に際し、該抗体の活性を保持させるために使用される物質とともに含まれていてもよい。このような担体や安定剤としては、ヒト血清アルブミン、ゼラチン等を例示することができる。医薬的に許容しうるとは、悪心、目眩、吐き気等投与に伴う望ましくない副作用、頻回投与時の製剤に対する免疫応答などが起きないことを意味する。また、医薬的に許容しうる適当な溶剤や希釈剤、安定化剤とともに溶解された液状の医薬用組成物でもよい。さらに上記の医薬組成物に加えて生体内における濃度調節を目的とするミクロスフィア、リポゾーム等の徐放移植体を含む医薬用組成物であってもよい。

本発明の医薬組成物は、TNF α またはその過剰生産が関与する病気や症状を予防または治療するために、例えば、敗血性ショック症状、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、マラリア等の患者に投与することができる。投与経路は必要に応じて選択でき、全身的には、静脈投与、経口投与、腹腔内投与、皮下投与、鼻腔内投与、経皮投与等により、または局所的には軟膏、ローション等により投与することができる。投与量は、医師が症状、患者の年齢、その他に応じて適宜決定してよい。

実施例

以下、本発明の実施例を説明するが、これらは本発明を具体例に基づいて説明するものであって、本発明を限定するものではない。

実施例 1. 抗ヒトTNF α マウス中和抗体3B10のH鎖及びL鎖可変領域cDNAクローニング

ヒトTNF α に対するマウス単クローナル抗体を分泌する3B10細胞 (J Immunol Methods 96, 57, 1987) の総RNAをRNase1 B試薬 (BIOTEX Laboratories社) を用いて分離し、この総RNAを用いランダムヘキサマーおよび逆転写酵素 (SuperScript Preamplification System、GIBCO BRL社製) を使ってcDNAを合成した。得られたcDNAよりpolymerase chain reaction (PCR) 法によりH鎖およびL鎖可変領域をコードするcDNAを增幅した。尚、L鎖可変領域のcDNAは、Huseらによって報告された配列 (Science 246, 1275, 1989) にしたがって合成した增幅用プライマーにより増幅し、またH鎖可変領域はKabatらにより報告されたH鎖アミノ酸配列 (U

S Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991)に基づいて設計した5'プライマー (5'-AGGTGAAGCTNGTGGAG/ATCTGG -3') とHuseらの3'プライマーを組み合わせてPCRを行うことにより増幅した。PCRには耐熱性DNAポリメラーゼ (AmpliTaq DNA polymerase、Perkin-Elmer社製) およびサーマルサイクラー (TRIO-Thermo-block、Biometra社製) を使用した。得られたcDNAの塩基配列はSangerらの方法に従い解析した (Proc. Natl Acad Sci USA 74, 5 463, 1977)。得られた3B10抗体のH鎖及びL鎖の可変領域の塩基配列を図1に示す。Kabatらの方法 (US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) またはChothiaらの方法 (J Mol Biol 196, 901, 1987) に従い、CDR領域を同定し、本発明においては、いずれかのCDR領域に含まれるアミノ酸配列を「CDR領域」とみなした。

実施例2. 抗ヒトTNF α に対するヒト・マウスキメラ抗体の発現ベクター作製

真核細胞用発現ベクターpdKCR-dhfr (Biochem Biophys Res Commun 164, 39, 1989) にマルチクローニングサイト (Eco RI, Mlu I, Spe I, Sal I) を導入した (以降pKDEMSSベクターと呼ぶ)。次に、pKDEMSSのジヒドロ葉酸還元酵素 (DH FR) 領域をpMAMneoCAT (CLONTECH社製) のネオマイシン耐性 (neor) 領域に置換した (以降pKNEMSSベクターと呼ぶ)。キメラH鎖発現ベクターは、HBS-1と呼ばれるヒト抗HBs抗体 (Gastroenterol Jpn 19, 344, 1984, J Immunol Methods 2 22, 83, 1999) の γ 1鎖のシグナル配列と、実施例1で得られた3B10のH鎖可変領域、およびHBS-1の γ 1鎖の定常領域を、N末側からこの順序でpKNEMSSベクターに組み込むことにより作製した (以降pKNH-c3B10と呼ぶ)。同様に、HBS-1の κ 鎖のシグナル配列と実施例1で得られた3B10のL鎖可変領域、およびHBS-1の κ 鎖の定常領域を、N末側からこの順序でpKDEMSSベクターに組み込むことによりキメラL鎖発現ベクターを作製した (以降pKDL-c3B10と呼ぶ)。図2にpKNH-c3B10及びpKDL-c3B10の構造を示す。

実施例3. ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体の構築

Satoらの方法 (Cancer Res 53, 851, 1993) に従い、マウス抗体3B10の6つのCDRをヒトIgGの対応する位置に置換した抗体遺伝子を構築した。図3に示されるように、まず、HBS-1抗体のL鎖のcDNAを鑄型として5回のPCRを実施することに

よりL鎖可変領域のcDNAフラグメントを作製した。初回のPCRではプライマーL1およびL2を用いて増幅を行った。増幅したフラグメントを5'プライマーとして用い、L3プライマーとの組み合わせで2回目のPCRを行った。同様にさらにL6プライマーまで使用した3回のPCRを実施し、最終的に目的とするL鎖可変領域cDNAフラグメントを作製した。H鎖可変領域のcDNAフラグメントについてもHBS-1のH鎖のcDNAを鋳型にPCRを繰り返すことにより作製した。ただし、2回目のPCRに用いた3'プライマーは重なりを持つ2種類のプライマーでPCRを行うことにより作製した。最終的に増幅されたこれらのL鎖およびH鎖可変領域cDNAフラグメントを実施例2で作製した抗ヒトTNF α に対するヒト・マウスキメラ抗体の発現ベクターpKDL-c3B10およびpKNH-c3B10の可変領域と置換することによりヒト型化抗体発現ベクターを構築した。各々のベクターで同時に形質転換した適当な宿主細胞を発現条件下で培養することにより、抗ヒトTNF α ヒト型化抗体を分泌させることができる（実施例4参照）。以上の操作で得られたヒト型化抗体をh3B10-1と命名した。

15 本実施例で使用したプライマーを表1に示す。なお、これらのプライマーでは、L鎖のフレームワーク部分の4番目、36番目、48番目、71番目のアミノ酸、およびH鎖の71番目、93番目のアミノ酸が、各々マウス3B10の対応するアミノ酸残基に置換されている。

表1

軽鎖

5 L1 5'-AGG TGT GAC GTC CAG TTG ACC CAG TCT CCA (配列番号：9)
 L2 5'-CTG ATA CCA GTG TAA ATA ACT GAA GCT AAC GCT CGA
 ACT CGC CGT ACA AGT GAT (配列番号：10)
 L3 5'-GAC CCC ACT TGC CAA ATT GGA TGT AGA ATA GAT CAG GAG CTT
 (配列番号：11)
 L4 5'-TGT GAG AGT GTA TTC TGT CCC AGA TCC ACT (配列番号：12)
 10 L5 5'-GCC GAA AGT GTA CGG GGA ACG AAG ATA CTG GTG ACA GTA
 (配列番号：13)
 L6 5'-CTC ATC AGA TGG CGG GAA GA (配列番号：14)

重鎖

15 H1 5'-CAG AAT TCA CCA TGG AGT TTG GGC TGA GCT (配列番号：15)
 H2 5'-GAC CCA GTT CAT ACC ATA GTT AGT GAA GGT GTA TCC AGA
 (配列番号：16)
 H3 5'-GAG TGG GTG GCA TGG ATA AAC ACT TAT ACA GGT GAG CCA ACC TAC GCA
 (配列番号：17)
 20 H4 5'-GTC TAA GGA AAT GGT GAA TCG GCC CTT GAA GTC GTC TGC GTA GGT TGG
 (配列番号：18)
 H5 5'-TCC CTG GCC CCA GTA GTC AAA TCC GTC ATA ATC ATA TCT TGC ACA GTA
 (配列番号：19)

25 実施例4. ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体の誘導体の構築

h3B10-1に更に変異を加えたヒト型化3B10抗体誘導体を8種作製した。変異は、H鎖およびL鎖のフレームワーク部分に導入した。すなわち、h3B10-1を鑄型として、変異を導入したプライマーを用いてPCRを行うことにより行った。PCRには耐熱性DNAポリメラーゼ (AmpliTaq DNA polymerase、Perkin-Elmer社製) およびサ

一マルサイクラー (TRIO-Thermo-block、Biometra社製) を使用した。作製した8種のヒト型化抗体 (h3B10-2~9と命名) 、h3B10-1H及びh3B10-1Lにおけるアミノ酸配列の異なる部分を表2にまとめた。なお、L鎖がh3B10-1と同じでH鎖のフレームワーク領域がHBS-1そのものである抗体をh3B10-1Hと命名し、H鎖がh3B10-1と同じでL鎖のフレームワーク領域がHBS-1そのものである抗体をh3B10-1Lと命名した。

表2 ヒト型化抗TNF α 抗体のフレームワーク領域の構造

抗体	H鎖のアミノ酸残基					L鎖のアミノ酸残基					
	3	46	71	78	93	3	4	36	46	47	71
m3B10	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>
c3B10	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>
HBS-1	Q	E	R	L	I	Q	M	F	R	L	F
h3B10-1	Q	E	<u>L</u>	L	<u>A</u>	Q	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	L	<u>Y</u>
h3B10-1H	Q	E	R	L	I	Q	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	L	<u>Y</u>
h3B10-1L	Q	E	<u>L</u>	L	<u>A</u>	Q	M	F	R	L	F
h3B10-2	<u>K</u>	E	<u>L</u>	L	<u>A</u>	Q	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	L	<u>Y</u>
h3B10-3	Q	<u>K</u>	<u>L</u>	L	<u>A</u>	Q	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	L	<u>Y</u>
h3B10-4	Q	E	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	Q	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	L	<u>Y</u>
h3B10-5	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	Q	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	L	<u>Y</u>
h3B10-6	Q	E	<u>L</u>	L	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	L	<u>Y</u>
h3B10-7	Q	E	<u>L</u>	L	<u>A</u>	Q	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>
h3B10-8	Q	E	<u>L</u>	L	<u>A</u>	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>
h3B10-9	<u>K</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	Q	<u>L</u>	<u>Y</u>	<u>L</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>

表2中、アミノ酸は1文字略字で示し、Kabatらの方法 (US Dept. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991) に従い番号を付した

。また、マウス由来の配列を下線で示した。

m3B10: 元のマウス抗TNF α 抗体;

c3B10: ヒト・マウスキメラ抗TNF α 抗体;

HBS-1: HBsに対するヒト抗体;

5 h3B10-1H: L鎖がh3B10-1と同じでH鎖のフレームワーク領域がHBS-1そのものである抗体;

h3B10-1L: H鎖がh3B10-1と同じでL鎖のフレームワーク領域がHBS-1そのものである抗体。

10 実施例5. ヒト型化抗ヒトTNF α 抗体及びその誘導体の発現とその解析

COS-1細胞 (ATCCより入手) を35mmシャーレに 3.0×10^5 個播種し18時間前培養した。実施例2～4で構築した合計9種類のヒト型化抗ヒトTNF α 抗体およびヒト・マウスキメラ抗体に対応する各々のH鎖発現ベクターとL鎖発現ベクターのペア各 $2\mu\text{g}$ ずつを $10\mu\text{l}$ のリポフェクトアミン試薬 (GIBCO BRL社製) を用いて同時にCOS-1細胞に導入した。遺伝子を導入した細胞から分泌される各組み換え型抗体のヒトTNF- α に対する結合性をELISA法により検討するとともに、FCA (Fluorescence Concentration Analyzer) 法と呼ばれる方法で培養上清中のヒトIgG量を定量した。ELISAは次のような方法で実施した。まず、96ウェルプレートの中央部60ウェルに $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトTNF- α を満たし室温で18時間インキュベートすることにより固相化した。ウェルを洗浄バッファー (0.1% Tween 20を含むphosphate-buffered saline (PBS)) で3回洗浄した後、1% BSAを含むPBSで2時間ブロッキングした。PBS-Tで3回洗浄した後、各々のCOS-1細胞上清と2時間反応させた。同様に洗浄を行った後、TNF- α に結合した抗体をパーオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG Fc抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories社製) またはパーオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG Fc抗体 (Caltag Laboratories社製) を反応させ、文献 (J Immunol Methods 143, 89, 1991) に記載の方法により検出を行った。一方、FCA法は、既に報告されている方法に準じ (Biochem Biophys Res Commun 193, 886, 1993) 、ヤギ抗ヒトIgG Fc抗体をコートしたFCA用パーティクルとFITCで標識したヤギ抗ヒトIgG Fc抗体を用い、既知濃度のヒトIgGを標準物質として

定量した。各COS-1細胞で発現した各ヒト型化抗体のヒトTNF α との結合性は種々の濃度のIgGに対するELISA反応量で表示した。

その結果、図4及び図5に示すように、いずれのヒト型化抗体においてもヒトTNF α に対する結合活性が認められ、h3B10-9において最も強い活性が確認され、
5 その強さはヒト・マウスキメラ抗体と同程度であった。抗体h3B10-1においても、ヒト・マウスキメラ抗体より弱い活性ながら、結合活性を有することが示された。対照として作製したh3B10-1Hやh3B10-1LにはヒトTNF α に対する結合性は認められなかった。

発明の効果

10 本発明で初めて提供された6つのCDRのアミノ酸配列およびそれをコードする遺伝子は、これらをヒトのIgGの対応する位置に置換することにより、ヒトTNF α に対し結合活性を保持したヒト型化抗体が得られることが示された。本発明で得られるヒト型化抗TNF α 抗体は、医薬品として利用した場合、ヒト体内での免疫原性がマウスなどの動物に由来する抗体に比較し極度に低下しており、より安全性が向上している。本発明によれば、TNF α が関与する種々の患者に対する投与
15 に際してヒトTNF α を認識するヒト型抗体を大量に調製することが可能となる。

請求の範囲

1.. 以下のアミノ酸配列を少なくとも1つ有するヒトTNF α に対する組換え型抗体のH鎖ポリペプチドまたはその断片：

- 5 a) CDR-H1が、CDR-H1として配列番号：1に記載のアミノ酸配列、
- b) CDR-H2が、CDR-H2として配列番号：2に記載のアミノ酸配列、
- c) CDR-H3が、CDR-H3として配列番号：3に記載のアミノ酸配列。

2. 配列番号：7に記載されたアミノ酸配列あるいは該アミノ酸配列において配列番号：1ないし3に記載されたアミノ酸配列以外の部分において1ないし数個のアミノ酸が欠失、付加または置換されたアミノ酸配列からなるヒトTNF α に対する抗体のH鎖可変領域を含む、ヒトTNF α に対する組換え型抗体のH鎖ポリペプチドまたはその断片。

3. 以下のアミノ酸配列を少なくとも1つ有するヒトTNF α に対する組換え型抗体のL鎖ポリペプチド：

- 15 a) CDR-L1が、CDR-L1として配列番号：4に記載のアミノ酸配列、
- b) CDR-L2が、CDR-L2として配列番号：5に記載のアミノ酸配列、
- c) CDR-L3が、CDR-L3として配列番号：6に記載のアミノ酸配列。

4. 配列番号：8に記載されたアミノ酸配列あるいは該アミノ酸配列において配列番号：4ないし6に記載されたアミノ酸配列以外の部分において1ないし数個のアミノ酸が欠失、付加または置換されたアミノ酸配列からなるヒトTNF α に対する抗体のL鎖可変領域を含む、ヒトTNF α に対する組換え型抗体のL鎖ポリペプチド。

5. 請求項1または2に記載のH鎖ポリペプチドまたはその断片をコードする遺伝子。

25 6. 請求項3または4に記載のL鎖ポリペプチドをコードする遺伝子。

7. 請求項5および/または6に記載の遺伝子を組み込んだ発現ベクター。

8. 請求項7に記載の発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、該宿主細胞をヒトTNF α に対する抗体を発現する条件下で培養し、宿主細胞により生産された抗体を回収することからなる、ヒトTNF α に対する組換え型抗体の製造方法。

9. 請求項 5 および／または 6 に記載の遺伝子、あるいは請求項 8 に記載の方法を用い、遺伝子組換え手法によって得ることのできるヒト TNF α に対する組換え型抗体またはその断片。

10. 請求項 9 に記載の抗体またはその断片と医薬的に許容し得る担体とから
5 なる医薬組成物。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1

(A) H鎖

	1	2	3
3B10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
HBS-1	Q V K L L E S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y T F T Q V Q L L E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S		
	4	5	
3B10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 a 3 4 5 6 7 8 9
HBS-1	N Y G M N W V K Q A P G K G L K W M G W I N T Y T G E P T Y S N S M H W V R Q A P G K G L E W V A V I L Y D G N H K F Y		
	6	7	8
3B10	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	0 1 2 a b c 3 4 5 6
HBS-1	A D D F K G R F A F S L E T S A S T A Y L Q I N N L K N E D A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L E V K S L Q T E D		
	9	0	1
3B10	7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	a b c 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3
HBS-1	M A T Y F C A R Y D Y D G F D Y W G Q G T T V T V S S T G V Y Y C I R D Q T Y G V H R F D S W G Q G T L V T V S S		

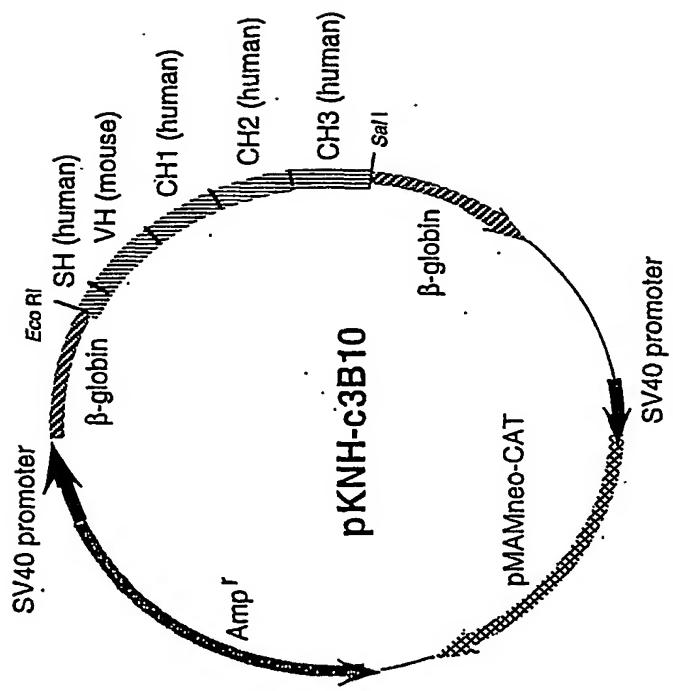
(B) L鎖

	1	2	3
3B10	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0
HBS-1	D V E L T Q S P A I M S A S L G E R V T M T C T A S S S V S D V Q M T Q S P S A M A A S V G D R V T I T C R A S Q G I G		
	4	5	1
3B10	1 2 a 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	1 2 3 4 5 6 7 8 9
HBS-1	P S Y L H W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P N Y L V W F Q Q K P G K V P K R L I Y A A S S L Q S G V P		
	6	7	8
3B10	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
HBS-1	A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C L		
	9	0	1
3B10	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 0	0 1 2 3 4 5 6 7	
HBS-1	Q Y L R S P Y T F G G G T K L E I K H H N N Y P L S F G G G T K V E I K		

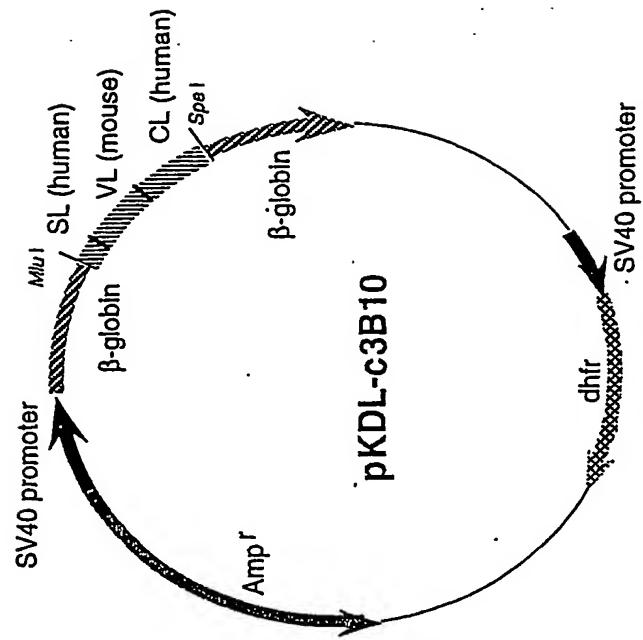
THIS PAGE BLANK (USPTO)

2

A



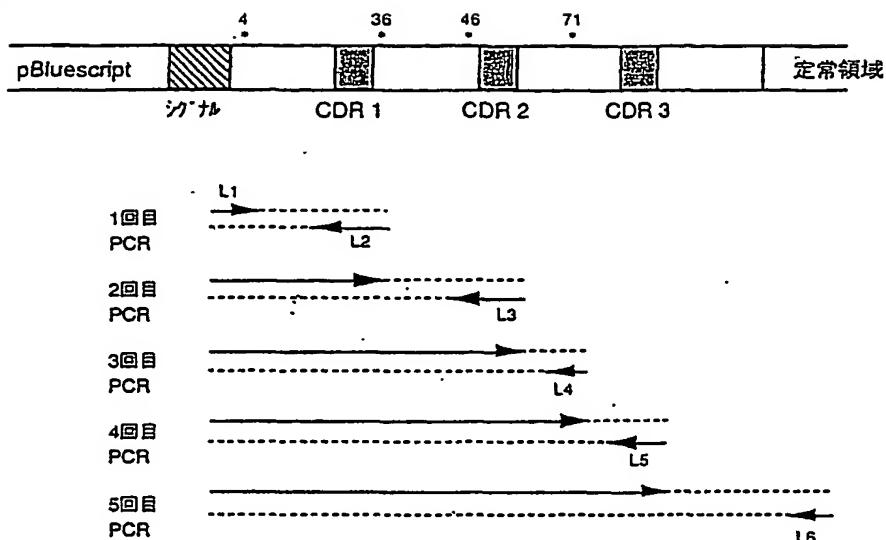
B



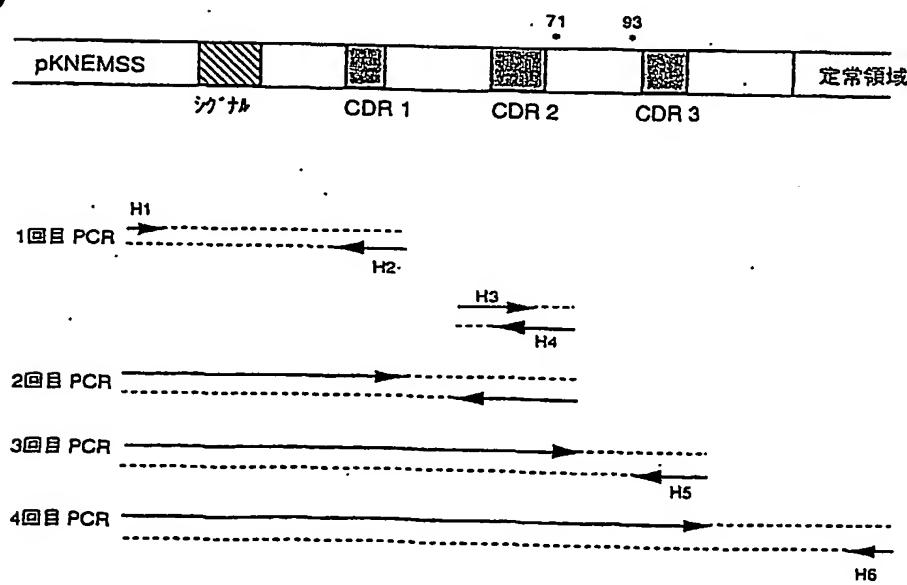
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3

(A)



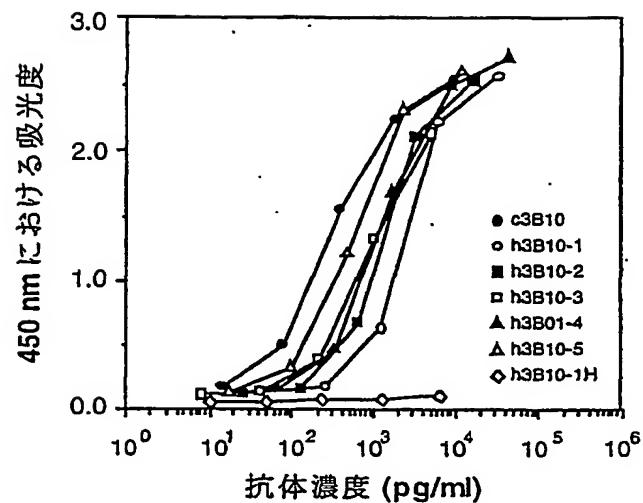
(B)



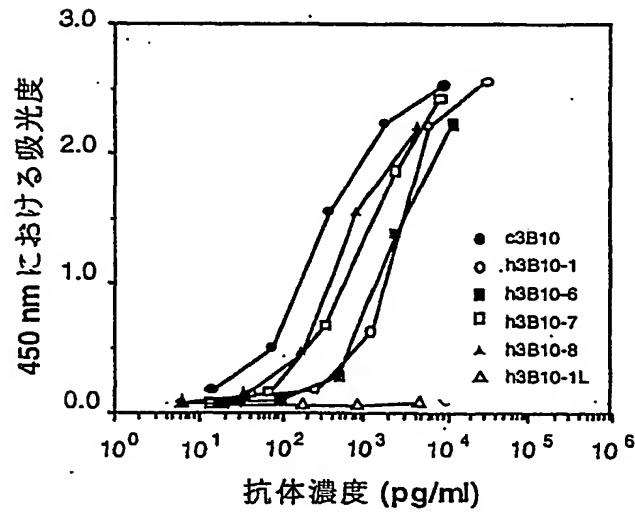
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 4

(A)



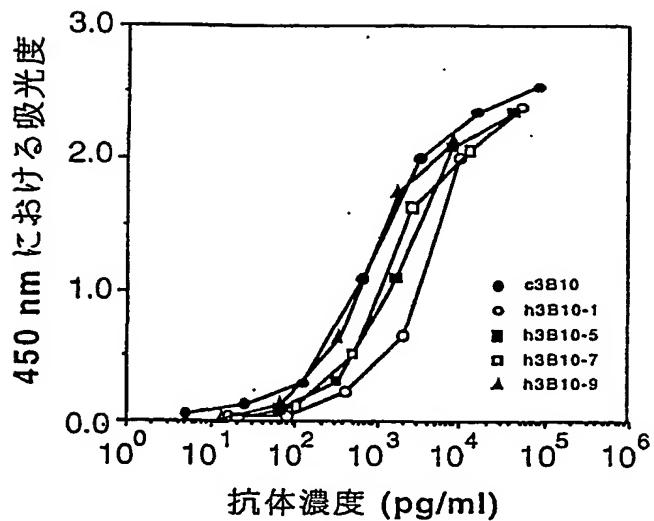
(B)



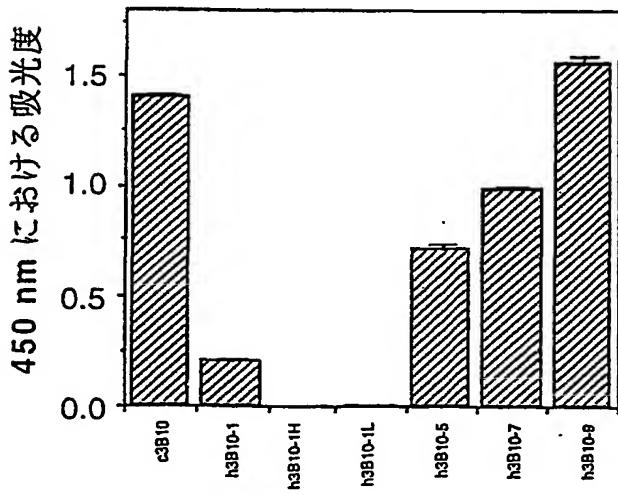
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 5

(A)



(B)



THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENCE LISTING

<110> Suntory Limited

<120> Novel recombinant antibody, amino acid sequences of its CDR regions and DNAs encoding said CDR regions

<130> YCT-588

<160> 19

<210> SEQ ID NO:1

<211> 10

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<223> CDR-H1 of anti-human TNF-alpha antibody

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

5

10

<210> SEQ ID NO:2

<211> 17

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<223> CDR-H2 of anti-human TNF-alpha antibody

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

5

10

15

Lys Gly

<210> SEQ ID NO:3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 8

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<223> CDR-H3 of anti-human TNF-alpha antibody

<400> 3

Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr

5

<210> SEQ ID NO:4

<211> 12

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<223> CDR-L1 of anti-human TNF-alpha antibody

<400> 4

Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Ser Tyr Leu His

5

10

<210> SEQ ID NO:5

<211> 8

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<223> CDR-L2 of anti-human TNF-alpha antibody

<400> 5

Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser

5

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> SEQ ID NO:6

<211> 9

<212> PRT

<213> mouse

<220>

<223> CDR-L3 of anti-human TNF-alpha antibody

<400> 6

His Gln Tyr Leu Arg Ser Pro Tyr Thr

5

<210> SEQ ID NO:7

<211> 351

<212> DNA

<213> mouse

<220>

<223> H-chain CDR region of anti-human TNF-alpha antibody

<400> 7

cag gtg aag ctg ctc gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48

Gln Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1

5

10

15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga tac acc ttt act aac tat 96

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20

25

30

ggt atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ttg aag tgg gtg 144

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Val

35

40

45

gca tgg ata aac act tat aca ggt gag cca acc tac gca gac gac ttc 192

Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe

50

55

60

THIS PAGE BLANK (USPTO)

aag ggc cga ttc acc att tcc tta gac aat tcc aag aac aca gcg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Leu Asp Asn Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
ctg gaa gtg aag agc ctg caa act gag gac acg ggt gtc tat tac tgt 288
Leu Glu Val Lys Ser Leu Gln Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
gca aga tat gat tat gac gga ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg 336
Ala Arg Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
gtc acc gtc tcc tca 351
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> SEQ ID NO:8

<211> 324

<212> DNA

<213> mouse

<220>

<223> L-chain CDR region of anti-human TNF-alpha antibody

<400> 8

gac gtc cag ttg acc cag tct cca tct gcc atg gct gca tct gta gga 48

Asp Val Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ala Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt acg gcg agt tcg agc gtt agc ttc agt 96

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Thr Ala Ser Ser Ser Val Ser Phe Ser

20 25 30

tat tta cac tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gtc cct aag ctc tgg 144

Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Trp

35 40 45

THIS PAGE BLANK (USPTO)

atc tat tct aca tcc aat ttg gca agt ggg gtc cca tcg agg ttc agc 192
Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60
ggc agt gga tct ggg aca gaa tac act ctc aca atc agc agc ctg cag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80
cct gaa gat ttt gca act tat tac tgt cac cag tat ctt cgt tcc ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Leu Arg Ser Pro
85 90 95
tac act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 324
Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> SEQ ID NO:9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer L1

<400> 9

aggtgtgacg tccagttgac ccagtctcca 30

<210> SEQ ID NO:10

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer L2

<400> 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ctgataccag tgtaaataac tgaagctaac gctcgaactc gccgtacaag tgat 54

<210> SEQ ID NO:11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer L3

<400> 11

gaccggactt gccaaattgg atgtagaata gatcaggagc tt

42

<210> SEQ ID NO:12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer L4

<400> 12

tgtgagagtgttattctgtcc cagatccact

30

<210> SEQ ID NO:13

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer L5

<400> 13

gccgaaagtgtacggggAAC gaagatactgttgacagta

39

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> SEQ ID NO:14

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 20

<223> Primer L6

<400> 14

ctcatcagat ggcgggaaga

20

<210> SEQ ID NO:15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer H1

<400> 15

cagaattcac catggagttt gggctgagct

30

<210> SEQ ID NO:16

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer H2

<400> 16

gaccaggatc ataccatagt tagtgaaggt gtatccaga

39

<210> SEQ ID NO:17

<211> 48

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer H3

<400> 17

gagtgggtgg catggataaa cacttataca ggtgagccaa cctacgca

48

<210> SEQ ID NO:18

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer H4

<400> 18

gtctaaggaa atggtaatc ggcccttgaa gtcgtctgcg taggttgg

48

<210> SEQ ID NO:19

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer H5

<400> 19

tccctggccc cagtagtcaa atccgtcata atcatatctt gcacagta

48

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K 16/24, C12N 15/13, C12P 21/08, A61K 39/395 // C12N 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K 16/24, C12N 15/13, C12P 21/08, A61K 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
JICST FILE (JOIS), REGISTRY (STN), CA (STN),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGAHIRA, K. et al., "Humanization of a mouse neutralizing monoclonal antibody against tumor necrosis factor- α (TNF- α)", J. Immunol. Methods, (1999), Vol.222, No.1-2, pages 83 to 92	1-10
Y	NAGAHIRA, K. et al., "Construction and expression of a mouse-human chimeric antibody against human tumor necrosis factor- α ", Immunol. Lett., (1998), Vol.64, No.2-3, pages 139 to 144	1-10
Y	HIRAI, M. et al., "Production and characterization of monoclonal antibodies to human tumor necrosis factor", J. Immunol. Methods, (1987), Vol.96, No.1, pages 57 to 62	1-10
Y	JP, 63-253099, A (Suntory Limited), 20 October, 1988 (20.10.88) (Family: none)	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 June, 2001 (18.06.01)Date of mailing of the international search report
26 June, 2001 (26.06.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03308

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 92/11383, A1 (Celltech Ltd.), 09 July, 1992 (09.07.92), & AU, 9191084, A & FI, 9203737, A & NL, 9120013, A & EP, 516785, A1 & GB, 2257145, A & NO, 9203231, A & DE, 4193302, T & PT, 99934, A & BR, 9106232, A & HU, 62661, T & JP, 5-507418, W & ES, 2084338, T3 & NZ, 241147, A & CA, 2129554, C & US, 5994510, A & KR, 253426, B1	1, 5, 7-10
X	EP, 882794, A2 (Kyowa Hakko Kogyo K.K.), 09 December, 1998 (09.12.98), & JP, 10-257893, A & AU, 9859420, A & CA, 2226400, A	3, 6-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K 16/24, C12N 15/13, C12P 21/08, A61K 39/395 // C12N 5/10

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' C07K 16/24, C12N 15/13, C12P 21/08, A61K 39/395

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTワイル(JOIS), REGISTRY(STN), CA(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	NAGAHIRA, K. et al. "Humanization of a mouse neutralizing monoclonal antibody against tumor necrosis factor- α (TNF- α)", J. Immunol. Methods (1999) Vol. 222, No. 1-2, p. 83-92	1-10
Y	NAGAHIRA, K. et al. "Construction and expression of a mouse-human chimeric antibody against human tumor necrosis factor- α ", Immunol. Lett. (1998) Vol. 64, No. 2-3, p. 139-144	1-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 18. 06. 01	国際調査報告の発送日 26.06.01
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高堀 栄二 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 9281

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/03308

C(続き) 引用文献の カテゴリー*	関連すると認められる文献 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	HIRAI, M. et al. "Production and characterization of monoclonal antibodies to human tumor necrosis factor", J. Immunol. Methods (1987) Vol. 96, No. 1, p. 57-62	1-10
Y	JP, 63-253099, A (サントリー株式会社) 20. 10月. 1988 (20. 10. 88) (ファミリーなし)	1-10
X	WO, 92/11383, A1 (CELLTECH LTD.) 9. 7月. 1992 (09. 07. 92) & AU, 9191084, A & FI, 9203737, A & NL, 9120013, A & EP, 516785, A1 & GB, 2257145, A & NO, 9203231, A & DE, 4193302, T & PT, 99934, A & BR, 9106232, A & HU, 62661, T & JP, 5-507418, W & ES, 2084338, T3 & NZ, 241147, A & CA, 2129554, C & US, 5994510, A & KR, 253426, B1	1, 5, 7-10
X	EP, 882794, A2 (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 9. 12月. 1998 (09. 12. 98) & JP, 10-257893, A & AU, 9859420, A & CA, 2226400, A	3, 6-7